

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odjel

Angelina Adamović

**PREŽIVLJAVANJE BAKTERIJA *ESCHERICHIA COLI*
I *ACINETOBACTER JUNII* PRI RAZLIČITIM
KONCENTRACIJAMA NATRIJEVOG KLORIDA**

Diplomski rad

Zagreb, 2010.

Ovaj rad, izrađen u Zavodu za mikrobiologiju pod neposrednim vodstvom doc. dr. sc. Jasne Hrenović, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesor biologije i kemije.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Jasni Hrenović, koja me je svojim znanjem i savjetima vodila kroz izradu diplomskog rada.
Također se zahvaljujem asistentu Tomislavu Ivankoviću, uz čiju sam pomoć uspješno izvela eksperimentalni dio diplomskog rada.
Naljepše se zahvaljujem svim kolegicama i kolegama na lijepim studentskim uspomenama, prijateljicama i prijateljima na druženjima, dečku na podršci
i naravno roditeljima na strpljenju i nesebičnoj potpori

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Preživljavanje bakterija *Escherichia coli* i *Acinetobacter junii* pri različitim koncentracijama natrijevog klorida

Angelina Adamović

Zavod za mikrobiologiju, Biološki odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Istraživano je preživljavanje dviju heterotrofnih bakterija u uvjetima različite koncentracije natrijevog klorida. Obje bakterije mogu doći u morski okoliš putem kanalizacije ili efluenata iz postrojenja za preradu otpadnih voda; *Escherichia coli* je uobičajena enterička bakterija, a *Acinetobacter junii* fosfat-uklanjajuća bakterija koja nastanjuje aktivni mulj. Kada su se uzgajale u mediju bogatom nutrijentima (KPK 8700 mg O₂ L⁻¹) obje bakterije su se razmnožavale tijekom 72 sata pri koncentracijama natrijevog klorida do 5% za *E. coli* i do 3,5% za *A. junii*. Ukupno umiranje *E. coli* detektirano je nakon 72 h pri koncentraciji natrijevog klorida od 20%. Ukupno umiranje *A. junii* detektirano je nakon 72 h pri koncentraciji natrijevog klorida od 10%. Kada su iste bakterije uzgajane u mediju siromašnom nutrijentima (KPK 90 mg O₂ L⁻¹) multiplikacija *E. coli* zaustavila se pri koncentraciji natrijevog klorida od 3,5% i višoj, no stanice su mogle preživjeti duži period vremena pri ekstremnim koncentracijama natrijevog klorida od 20 i 30%. Negativan utjecaj natrijevog klorida na *A. junii* vidljiv je u uvjetima nedostatka organske tvari i brzo umiranje je uočeno pri koncentraciji natrijevog klorida od 3,5% i više. Rezultati pokazuju da su obje bakterije osmotolerantne kad su uzgajane u mediju bogatom nutrijentima, ali ne i u mediju siromašnom nutrijentima.

(37 stranica, 15 slika, 6 tablica, 41 literaturni navod, jezik izvornika : hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: enterička bakterija, fosfat-uklanjajuća bakterija, razmnožavanje, umiranje,

Nutrient Broth

Voditelj: dr.sc. Jasna Hrenović, doc.

Ocjenitelji: dr.sc. Jasna Hrenović, doc.

dr.sc. Iva Juranović Cindrić, doc.

dr.sc. Ivančica Ternjej, doc.

dr.sc. Draginja Mrvoš Sermek, doc.

dr.sc. Jasna Lajtner, doc.

Rad prihvaćen: 10. studenog 2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Survival of bacterias *Escherichia coli* and *Acinetobacter junii* at various concentrations of sodium chloride

Angelina Adamović

Department of Microbiology, Division of Biology, Faculty of Science
University of Zagreb
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The survival of two heterotrophic bacteria in conditions of various concentrations of sodium chloride was researched. Both bacteria can commonly enter marine environments through sewage or wastewater treatment plant effluents; the *Escherichia coli* is a common enteric bacterium and *Acinetobacter junii* is a phosphate-accumulating bacterium inhabiting activated sludge. When cultivated in nutrient rich media (COD 8700 mg O₂ L⁻¹), both bacteria were multiplying during 72 h at concentrations of sodium chloride up to 5% for *E. coli* and 3.5% for *A. junii*. Total die-off of *E. coli* was detected at 72 h by sodium chloride concentration of 20%. Total die-off of *A. junii* was detected at 72 h by sodium chloride concentration of 10%. When the same bacteria were cultured at nutrient depleted media (COD 90 mg O₂ L⁻¹), the multiplication of *E. coli* stopped at 3.5% of sodium chloride and higher, but the cells were able to survive for longer period of time at extreme sodium chloride concentrations of 20 and 30%. The negative influence of sodium chloride to *A. junii* was pronounced in conditions of organic matter shortage and rapid die-off was observed at 3.5% of sodium chloride and higher. Both bacteria seemed to be osmotolerant when cultured in nutrient-rich media, but not in nutrient-depleted media.

(37 pages, 15 images, 6 tables, 41 references, original in: Croatian)

This research study is deposited in Central Biological Library

Key words: enteric bacteria, phosphate-accumulating bacteria, propagation, dying, Nutrient Broth

Supervisor: Dr.sc. Jasna Hrenović, Asst. Prof.

Reviewers: Dr.sc. Jasna Hrenović, Asst. Prof.

Dr.sc. Iva Juranović Cindrić, Asst. Prof.

Dr.sc. Ivančica Ternjej, Asst. Prof.

Dr.sc. Draginja Mrvoš Sermek, Asst. Prof.

Dr.sc. Jasna Lajtner, Asst. Prof.

The research study accepted: 10th November 2010

SADRŽAJ

| | |
|-------------------------------------------------------|-----------|
| 1. UVOD | 7 |
| 1.1. OPĆE ZNAČAJKE ISTRAŽIVANIH BAKTERIJA..... | 9 |
| 1.1.1. <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 9 |
| 1.1.2. <i>ACINETOBACTER JUNII</i> | 10 |
| 1.2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 11 |
| 2. MATERIJALI I METODE RADA | 12 |
| 2.1. PRIPRAVA MATERIJALA..... | 13 |
| 2.2. IZVOĐENJE EKSPERIMENTA..... | 14 |
| 3. REZULTATI | 17 |
| 4. RASPRAVA | 28 |
| 5. ZAKLJUČAK | 32 |
| 6. LITERATURA | 34 |

1. UVOD

Preživljavanje bakterija u morskom okolišu zanimljivo je s ekološkog i zdravstvenog stajališta. U morski okoliš bakterije mogu doći putem kanalizacije, ali i putem efluenata iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Upravo uz mjesta izljeva je koncentracija enteričkih bakterija najveća, dok se s udaljenošću od obale njihova koncentracija smanjuje pa je već 2 km od obale njihova gustoća niska ili ih uopće nema (Delille i Delille 2000). To je posljedica razrjeđenja, ali i nepreživljavanja heterotrofnih bakterija u morskoj vodi. Vrijeme preživljavanja bakterija je veoma varijabilno i ovisi o karakteristikama organizma, ali i o nekoliko drugih čimbenika (Carlucci i Pramer 1960a). Na preživljavanje enteričkih bakterija u morskoj vodi najviše utječu slanost, dostupnost nutrijenata, mikrobní antagonizam i antibiotske supstance (Carlucci i Pramer 1959, 1960b).

Različite vrste bakterija različito podnose salinitet pa se na temelju toga mogu svrstati u nekoliko skupina. Osmotolerantnima nazivamo one bakterije koje mogu podnijeti visoke koncentracije natrijevog klorida, do približno 10%. Organizmi koji za svoj rast i razvoj trebaju visoke koncentracije natrijevog klorida zovu se halofilni organizmi. Oni se uglavnom klasificiraju kao blago, umjereno i ekstremno halofilni (Tablica 1).

Tablica 1. Tolerancija različitih vrsta bakterija na natrijev klorid (Garritý et al. 2003).

| klasifikacija | rod | vrsta | tolerancija na NaCl |
|--------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------|
| blagi halofili | <i>Clostridium</i> | <i>C. botulinum</i> <i>C. sporogenes</i> <i>C. perfringens</i> | 0-5% |
| | <i>Bacillus</i> | <i>B. cereus</i> | 0-2,8% |
| umjereni halofili | <i>Enterococcus</i> | <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. avium</i> | 6,5% |
| | <i>Halobacillus</i> | <i>H. halophilus</i> | 3-10% |
| ekstremni halofili | <i>Staphylococcus</i> | <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. saprophyticus</i> | 15% |
| | <i>Halococcus</i> | <i>H. morrhuae</i> | 25-30% |
| Osmotolerantni | <i>Micrococcus</i> | <i>M. luteus</i> | 5-15% |
| | <i>Streptococcus</i> | <i>S. thermophilus</i> | 4-10% |
| | <i>Vibrio</i> | <i>V. mimicus</i> | 6-10% |
| | | <i>V. cholerae</i> | |
| | <i>Salmonella</i> | <i>S. typhimurium</i> | 9% |
| | <i>Leuconostoc</i> | <i>L. mesenterideus</i> <i>L. lactis</i> | 3-6,5% |

Mnoge morske vrste bakterija su blago halofilne i zahtijevaju koncentraciju natrijevog klorida od oko 3% (Nester et al. 2004).

1.1.OPĆE ZNAČAJKE ISTRAŽIVANIH BAKTERIJA

1.1.1. *Escherichia coli*

Carstvo: BACTERIA

Koljeno: PROTEOBACTERIA

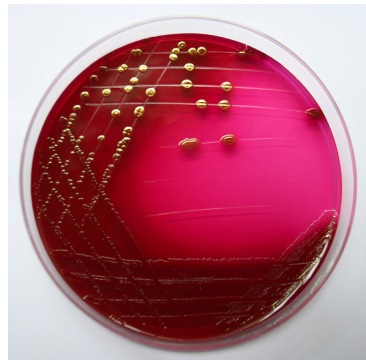
Razred: GAMMAPROTEOBACTERIA

Red: ENTEROBACTERIALES

Porodica: ENTEROBACTERIACEAE

Rod: ESCHERICHIA

Vrsta: *Escherichia coli*



Slika 1. *Escherichia coli* na Endo agaru

Escherichia coli je štapićasta Gram-negativna bakterija. Mogu biti aerobne i fakultativno anaerobne, a većina na svojoj površini ima flagele pa su pokretne. Otporna je bakterija pa tako može mjesecima živjeti u vodi i zemlji, a duže vrijeme i na predmetima. Za većinu serotipova optimalna temperatura je 37° C, a izlaganje temperaturi od 60° C na 15 min ih ubija (www.zdravlje.hr).

E. coli (Slika 1) jedna je od najistraženijih bakterija i uzima se kao modelni organizam za bakterije. Važnu ulogu ima u suvremenom biološkom inženjerstvu, gdje se često koristi za proizvodnju veće količine DNK i/ili proteina. Jedna od prvih primjena tehnologije rekombinantne DNK bila je genetička manipulacija *E. coli* za proizvodnju inzulina (www.hr.wikipedia.org).

E. coli ubraja se u grupu koliformnih bakterija, odnosno bakterija koje se redovito nalaze u stolici i čija je prisutnost u piću ili namirnicama indikator fekalne kontaminacije. Široko je rasprostranjena u prirodi. Kod sisavaca se normalno nalazi u donjem dijelu probavnog trakta i nužna je za pravilnu probavu hrane (<http://hr.wikipedia.org>). Normalno nije patogena, no ako dođe iz crijeva u neke druge organe i tkiva, izaziva bolesti, najčešće infekcije mokraćnih i spolnih organa (www.zdravlje.hr). Posebno virulentan soj za čovjeka je O157:H7, koji uzrokuje jaku crijevnu infekciju. Infekcije *E. coli* liječe se antimikrobnim lijekovima, a sprječavaju mjerama osobne higijene i higijenskog načina prenošenja hrane (www.zdravlje.hr).

1.1.2. *Acinetobacter junii*

Carstvo: BACTERIA

Koljeno: PROTEOBACTERIA

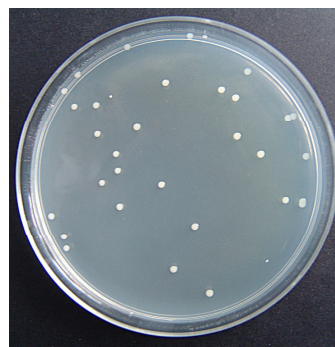
Razred: GAMMAPROTEOBACTERIA

Red: PSEUDOMONADALES

Porodica: MORAXELLACEAE

Rod: ACINETOBACTER

Vrsta: *Acinetobacter junii*



Slika 2. *Acinetobacter junii*
na hranjivom agaru

Red *Acinetobacter* obuhvaća nepokretne, strogo aerobne, oksidaza-negativne, Gram-negativne bakterije. Zasad su poznate dvadeset i četiri vrste unutar ovog roda. Dobro rastu na jednostavnim podlogama i tvore kolonije promjera 1,0-2,0 mm (Nemec et al. 2003).

Vrste iz roda *Acinetobacter* u prirodi su široko rasprostranjene. Žive na kako vlažnim, tako i suhim staništima te doprinose mineralizaciji tla (<http://hr.wikipedia.org>). Neke vrste roda *Acinetobacter* sudjeluju u biodegradaciji raznih zagađivača kao što su bifenili, klorirani bifenili, fenoli, benzoati, neprerađena ulja i acetonitril, a također i u uklanjanju fosfata i teških metala (Abdel-El-Haleem 2003).

Osim što su vrste roda *Acinetobacter* česti saprofiti, oni su također prisutni i u bolničkom okruženju, gdje su značajni patogeni, koji brzo stječu otpornost i na najsnažnije antimikrobne lijekove (Dworkin i Falkow 2006). Klinički najrelevantniji patogeni roda *Acinetobacter* su *A. baumannii* i slični sojevi, koji uzrokuju infekcije središnjeg živčanog sustava, kože, mekog tkiva, kosti (Peleg et al. 2008) i bakterijemiju u nedonoščadi i pedijatrijskih onkoloških pacijenata (www.ncbi.nlm.nih.gov). Bakterije roda *Acinetobacter* izvan grupe *A. baumannii* rijetko uzrokuju infekcije (Peleg et al. 2008).

Acinetobacter junii prvotno je izolirana iz ljudskog urina (www.thelabrat.com). *A. junii* korištena u ovom istraživanju (Slika 2) izolirana je iz aktivnog mulja 1975. godine. Pripada skupini fosfat-akumulirajućih bakterija, tj. uzima fosfat iz otpadnih voda u količinama koje premašuju metaboličku potrebu bakterije i višak fosfata taloži u obliku netopivih zrnaca fosfata unutar stanice (www.biol.pmf.hr). Zbog navedenog svojstva vrste roda *Acinetobacter* koriste se u biološkom pročišćavanju voda kao sastojak aktivnog mulja (Hrenović et al. 2009).

1.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je istražiti preživljavanje bakterija *Escherichia coli* i *Acinetobacter junii* pri različitim koncentracijama natrijevog klorida, odnosno pronaći maksimalnu koncentraciju natrijevog klorida pri kojoj se bakterije mogu aktivno razmnožavati.

Drugi cilj istraživanja bio je odrediti kao dostupnost organske tvari utječe na preživljavanje istih bakterija pri različitim koncentracijama natrijevog klorida.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. PRIPRAVA MATERIJALA

U istraživanju su korištene dvije vrste bakterija: *Escherichia coli* soj DSM 498 i *Acinetobacter junii* soj DSM 1532. Obje bakterije nabavljene su od Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH.

Medij korišten za uzgoj bakterija je Nutrient Broth, nabavljen od Biolife, Italija. To je medij bogat nutrijentima s kemijskom potrošnjom kisika (KPK) od 8700 mg O₂ L⁻¹.

Sastav Nutrient Brotha:

| | |
|------------------|-----------|
| pepton | 5,0 g |
| mesni ekstrakt | 3,0 g |
| destilirana voda | 1000 mL |
| pH | 7,0 ± 0,2 |

Za ispitivanje stope preživljavanja u mediju siromašnom nutrijentima korišten je isti medij, no razrijeđen sto puta (NB:100).

Prije autoklaviranja (121 °C / 15 min) mediju su dodane odgovarajuće količine natrijevog klorida (Kemika, Hrvatska) da bi se postigle koncentracije od 0,0, 0,4, 3,5, 5,0, 7,0, 10,0, 20,0 i 30,0% natrijevog klorida te podešen pH na 7,00 ± 0,10. Podešavanje je izvršeno koristeći WTW 330 pH-metar i vodene otopine natrijevog hidroksida i klorovodične kiseline koncentracija 1 mol dm⁻³.

2.2. IZVOĐENJE EKSPERIMENTA

Čiste kulture *E. coli* i *A. junii* uzgajane su na hranjivoj agarskoj ploči tijekom 16 sati pri temperaturi od $32 \pm 0,1$ °C. Biomasa je potom resuspendirana u 9 mL sterilne 0,3% otopine natrijevog klorida. Koncentracija bakterija iznosila je približno 10^8 vijabilnih bakterijskih stanica po mL. Po 1 mL resuspendirane biomase ionkuliran je u Erlenmeyerove tikvice s po 100 mL Nutrient Brotha različitih koncentracija natrijevog klorida. Tikvice su inkubirane 72 sata u vodenoj kupelji na $32 \pm 0,5$ °C i 70 okretaja u minuti (Slika 3).



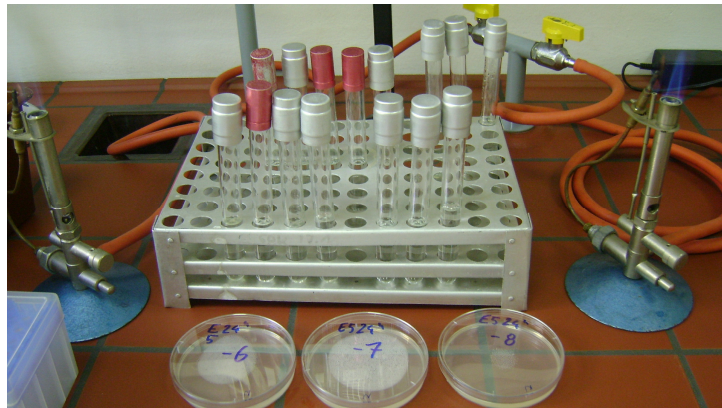
Slika 3. Vodena kupelj s treslicom

Početni broj vijabilnih stanica određen je prije inkubacije, a potom se broj vijabilnih stanica u bočicama određivao svaki dan kroz 72h nakon perioda inkubacije od 24h. Budući da se ne može sa sigurnošću tvrditi da iz svake vijabilne stanice nastaje kolonija, broj poraslih kolonija izražava se kao broj jedinica koje stvaraju kolonije (engl. Colony Forming Units, CFU):

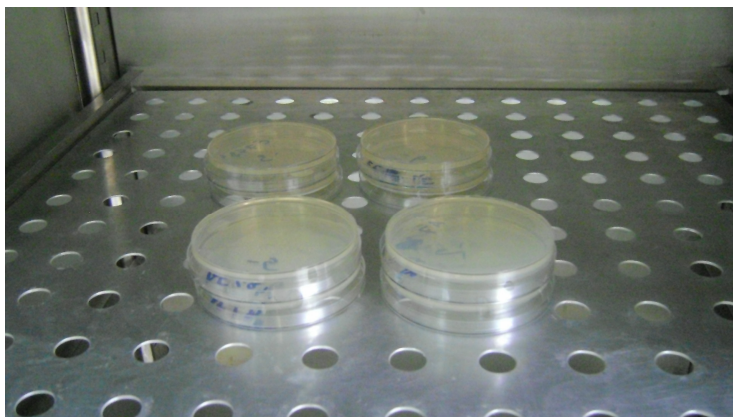
$$\text{CFU} = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen inokuluma}} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja uzorka}$$

Za izračun se uzimaju samo brojive ploče, tj. ploče na kojima je poraslo između 10 i 300 bakterijskih kolonija. Ukoliko ima više brojivih ploča u jednoj seriji, konačan broj CFU je srednja vrijednost brojivih ploča.

Svaki 24h uziman je po 1 mL bakterijskih suspenzija iz svake od tikvica te je napravljena serija decimalnih razrjeđenja od 10^{-1} do 10^{-9} (Slika 4). Volumeni od 0,1 mL su potom nacijepljeni na ploče s agarom i inkubirani 24h na temperaturi od $32 \pm 0,1$ °C (Slika 5).

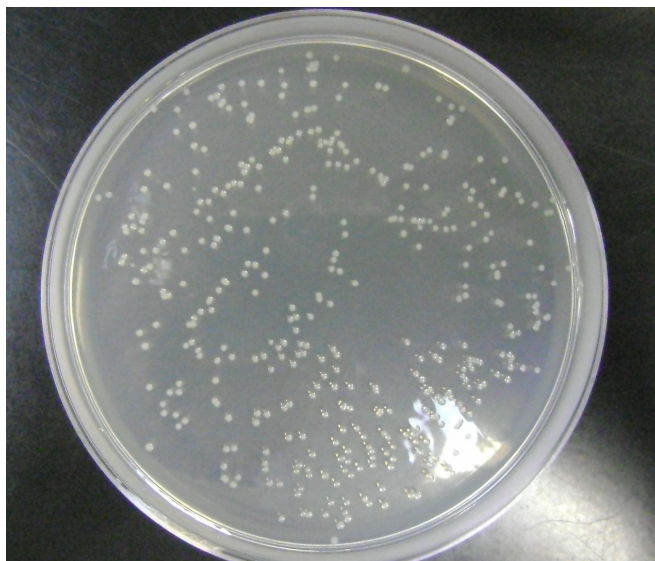


Slika 4. Serija decimalnih razrjeđenja i nasađivanje u Petrijeve zdjelice

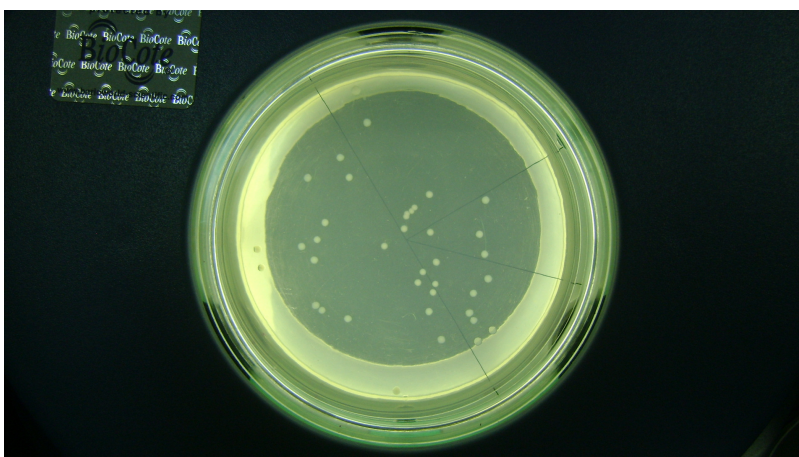


Slika 5. Inkubacija Petrijevih ploča u termostatu

Nakon 24h inkubacije narasle bakterijske kolonije (Slika 6) prebrojane su pomoću brojača (Slika 7) i njihov broj je izražen kao CFU L⁻¹.



Slika 6. Porasle kolonije *Escherichia coli*



Slika 7. Brojanje naraslih kolonija *Escherichia coli* na brojaču

Isti postupak primijenjen je za istraživanje preživljavanja na podlozi siromašnom nutrijentima (KPK 90 mg O₂ L⁻¹), uz razliku što je korištena podloga za uzgoj bakterija NB:100.

Sva mjerenja rađena su troduplo i predstavljene su srednje vrijednosti.

Rezultati su statistički obrađeni koristeći program Statistica, verzija 7.1.

3. REZULTATI

U prvoj seriji pokusa *E. coli* i *A. junii* uzgajane su na podlozi bogatoj nutrijentima s koncentracijama natrijevog klorida u rasponu od 0,0 do 30,0%. Dobiveni rezultati pokazali su da se pri nižim koncentracijama natrijevog klorida bakterije aktivno razmnožavaju, dok povećanje koncentracije natrijevog klorida smanjuje mogućnost replikacije pa jedno vrijeme broj bakterijskih stanica ne raste, da bi kasnije bio zamjetan pad broja stanica, što bi značilo da s vremenom dolazi do njihovog propadanja.

Za *E. coli* podaci o broju bakterijskih stanica izraženi kao CFU vidljivi su u Tablici 2.

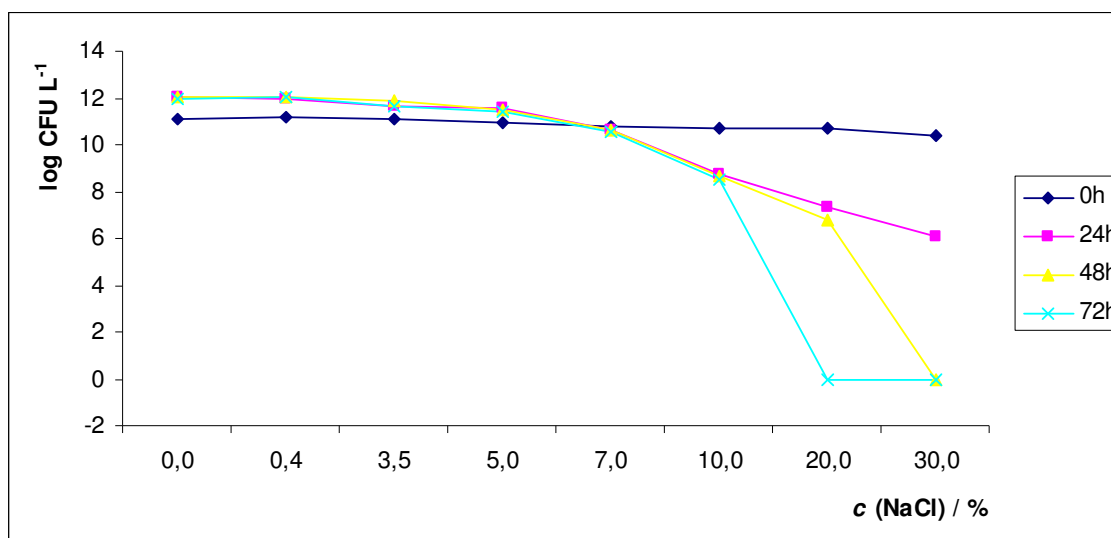
Tablica 2. Srednja vrijednost CFU *Escherichia coli* nakon različitih perioda inkubacije u mediju bogatom nutrijentima s različitim koncentracijama natrijevog klorida.

| NaCl (%) | CFU <i>E. coli</i> L ⁻¹ | | | |
|----------|------------------------------------|----------|----------|----------|
| | 0h | 24h | 48h | 72h |
| 0,0 | 1,34E+11 | 1,02E+12 | 1,15E+12 | 9,75E+11 |
| 0,4 | 1,60E+11 | 9,52E+11 | 1,10E+12 | 1,05E+12 |
| 3,5 | 1,16E+11 | 4,48E+11 | 7,58E+11 | 4,33E+11 |
| 5,0 | 8,89E+10 | 3,69E+11 | 3,04E+11 | 2,80E+11 |
| 7,0 | 5,61E+10 | 3,95E+10 | 3,94E+10 | 3,24E+10 |
| 10,0 | 5,51E+10 | 5,56E+08 | 5,04E+08 | 3,17E+08 |
| 20,0 | 5,26E+10 | 2,15E+07 | 6,60E+06 | 0 |
| 30,0 | 2,29E+10 | 1,15E+06 | 0 | 0 |

Iz navedenih podataka vidljivo je da se nakon 24h u kontrolnoj tikvici (koncentracija natrijevog klorida 0,0%) broj *E. coli* povećao za cijeli red veličine. Slično povećanje broja bakterija vidljivo je i pri koncentraciji natrijevog klorida od 0,4%, a značajno povećanje broja bakterijskih stanica vidljivo je i u tikvicama s koncentracijom natrijevog klorida od 3,5 i 5,0%. Pri koncentraciji natrijevog klorida od 7,0% broj bakterijskih stanica je podjednak pa se može zaključiti da pri toj koncentraciji bakterije mogu živjeti, no ne mogu se aktivno replicirati.

Pri još većim koncentracijama zamjetan je pad broja stanica, tako da je pri koncentraciji natrijevog klorida od 10,0% već nakon 24h taj broj manji za dva reda veličine, kod koncentracije natrijevog klorida od 20,0% nakon 24h taj broj manji je za tri reda veličine, a pri koncentraciji natrijevog klorida od 30,0% taj pad iznosi čak četiri reda veličine. Nula se dostiže nakon 72h izloženosti koncentraciji natrijevog klorida od 20,0%, odnosno nakon 48h izloženosti koncentraciji natrijevog klorida od 30,0%.

Navedeni podaci prikazani su i na Slici 8.



Slika 8. Srednja vrijednost logaritma CFU *Escherichia coli* nakon različitih perioda inkubacije u mediju bogatom nutrijentima s različitim koncentracijama natrijevog klorida.

Do koncentracije natrijevog klorida od 7,0% broj bakterija se povećavao kroz 48h da bi nakon 72h on bio u opadanju. Razlog za pad broja bakterija vjerojatno je ulazak u fazu gladovanja, tj. u fazu kada nema dovoljno nutrijenata, no unatoč smanjenju broja stanica, on je i dalje veći od početnog broja. Pri koncentraciji natrijevog klorida od 7,0% broj bakterija je podjednak kroz 72h, dok je primjetan pad broja stanica pri koncentracijama većim od 10,0%.

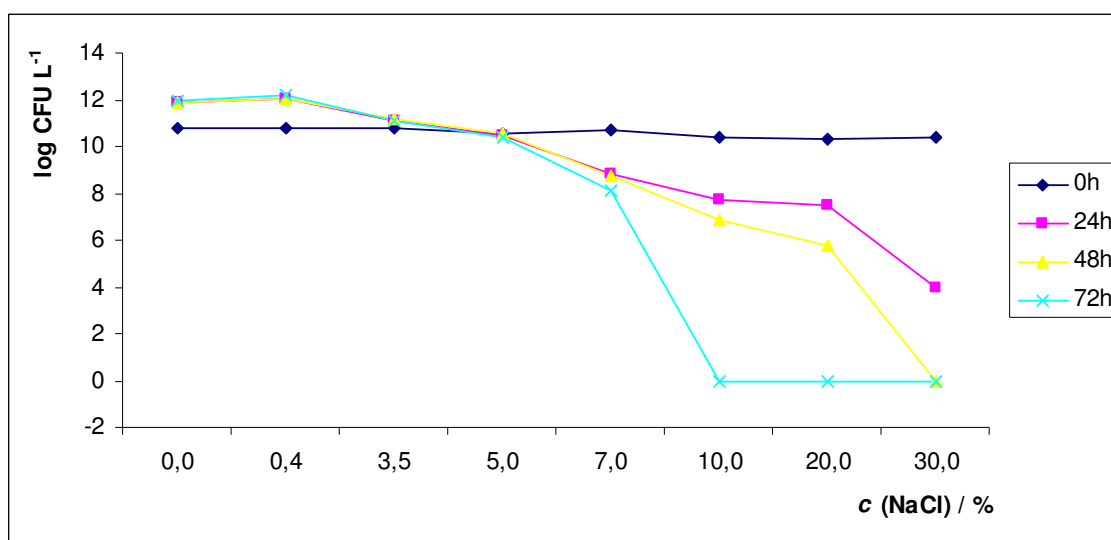
Za *A. junii* dobiveni su slični rezultati (Tablica 3).

Tablica 3. Srednja vrijednost CFU *Acinetobacter junii* nakon različitih perioda inkubacije u mediju bogatom nutrijentima s različitim koncentracijama natrijevog klorida.

| NaCl (%) | CFU <i>A. junii</i> L ⁻¹ | | | |
|----------|-------------------------------------|----------|----------|----------|
| | 0h | 24h | 48h | 72h |
| 0,0 | 6,11E+10 | 7,39E+11 | 7,90E+11 | 8,70E+11 |
| 0,4 | 6,39E+10 | 1,08E+12 | 1,11E+12 | 1,51E+12 |
| 3,5 | 5,71E+10 | 1,36E+11 | 1,45E+11 | 1,18E+11 |
| 5,0 | 3,85E+10 | 2,90E+10 | 3,25E+10 | 2,56E+10 |
| 7,0 | 5,05E+10 | 6,99E+08 | 5,50E+08 | 1,35E+08 |
| 10,0 | 2,44E+10 | 4,89E+07 | 7,04E+06 | 0 |
| 20,0 | 1,95E+10 | 2,85E+07 | 5,52E+05 | 0 |
| 30,0 | 2,29E+10 | 9,50E+03 | 0 | 0 |

Kod *A. junii* je također primjetno povećanje broja bakterijskih stanica za cijeli red veličine već unutar 24h i to za koncentracije natrijevog klorida od 0,0, 0,4 i 3,5%. Pri koncentraciji natrijevog klorida od 5,0% broj bakterijskih stanica je kroz čitava 72h podjednak, odnosno bakterije preživljavaju, ali se ne razmnožavaju. Kod koncentracija natrijevog klorida viših od 5,0% smanjuje se broj bakterija za dva reda veličine unutar 24h pri koncentraciji natrijevog klorida od 7,0%, za tri reda veličine pri koncentracijama natrijevog klorida od 10,0 i 20,0%, odnosno za čak sedam redova veličine pri koncentraciji natrijevog klorida od 30,0%.

Isti rezultati vidljivi su i na Slici 9.



Slika 9. Srednja vrijednost logaritma CFU *Acinetobacter junii* nakon različitih perioda inkubacije u mediju bogatom nutrijentima s različitim koncentracijama natrijevog klorida.

Rezultati pokazuju da pri koncentraciji natrijevog klorida od 5,0% više nema replikacije stanica, dok je pri 7,0% zamijećeno propadanje stanica. Pri većim koncentracijama natrijevog klorida propadanje je brže, a nula je postignuta nakon 72h pri koncentracijama natrijevog klorida od 10,0 i 20,0%, odnosno nakon 48h pri koncentraciji natrijevog klorida od 30,0%.

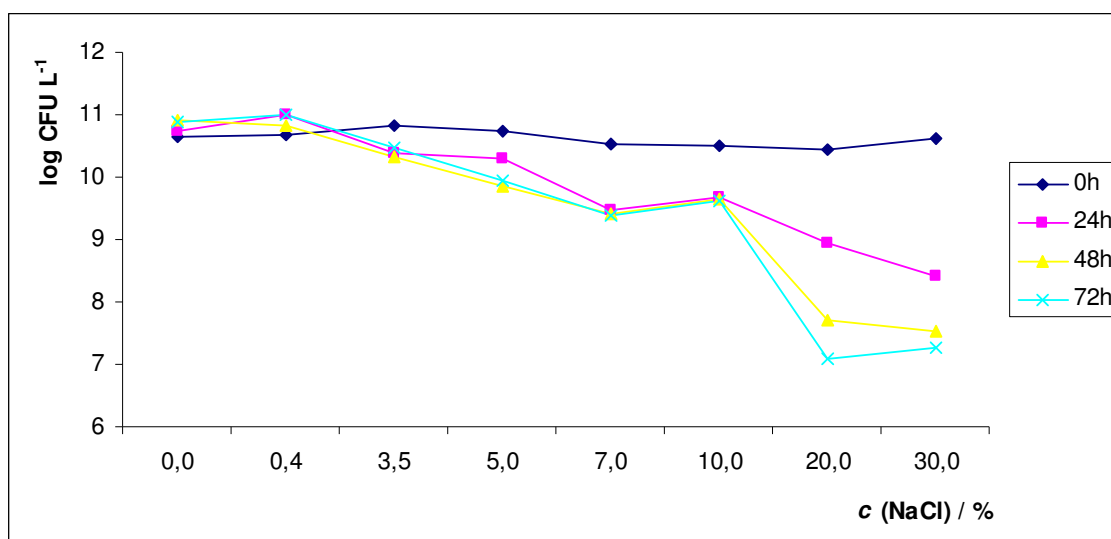
U uvjetima smanjene koncentracije nutrijenata negativan utjecaj saliniteta na ispitivane bakterijske stanice još je izraženiji. Povećanje broja stanica bitno je sporije, a propadanje stanica brže u odnosu na podlogu bogatu nutrijentima pa se stoga potpuno odsustvo bakterija postiže pri nižim koncentracijama natrijevog klorida.

Podaci za *E. coli* dostupni su u Tablici 4.

Tablica 4. Srednja vrijednost CFU *Escherichia coli* nakon različitih perioda inkubacije u mediju siromašnom nutrijentima s različitim koncentracijama natrijevog klorida.

| NaCl (%) | CFU <i>E. coli</i> L ⁻¹ | | | |
|----------|------------------------------------|----------|----------|----------|
| | 0h | 24h | 48h | 72h |
| 0,0 | 4,30E+10 | 5,55E+10 | 8,40E+10 | 7,45E+10 |
| 0,4 | 4,79E+10 | 9,90E+10 | 6,55E+10 | 1,02E+11 |
| 3,5 | 6,65E+10 | 2,40E+10 | 2,11E+10 | 2,93E+10 |
| 5,0 | 5,31E+10 | 1,98E+10 | 7,10E+09 | 8,80E+09 |
| 7,0 | 3,35E+10 | 3,05E+09 | 2,65E+09 | 2,35E+09 |
| 10,0 | 3,20E+10 | 4,85E+09 | 4,40E+09 | 4,23E+09 |
| 20,0 | 2,72E+10 | 8,50E+08 | 5,00E+07 | 1,20E+07 |
| 30,0 | 4,25E+10 | 2,50E+08 | 3,50E+07 | 1,85E+07 |

Inkubacija u mediju siromašnom nutrijentima pokazala je da se broj bakterija u kontrolnoj tikvici povećavao kroz 48h, no mnogo sporije nego na mediju bogatom nutrijentima iste koncentracije natrijevog klorida. Povećanje broja bakterija vidljivo je i pri koncentraciji natrijevog klorida od 0,4%, no samo u prva 24h. Već nakon 48h primjetno je smanjenje broja bakterija kao posljedica ulaska u fazu gladovanja. Pri koncentracijama natrijevog klorida većim od 0,4% nije dolazilo do povećanja broja bakterija, već do smanjenja. Pad broja bakterija je izraženiji što je koncentracija natrijevog klorida veća (Slika 10).



Slika 10. Srednja vrijednost logaritma CFU *Escherichia coli* nakon različitih perioda inkubacije u mediju siromašnom nutrijentima s različitim koncentracijama natrijevog klorida.

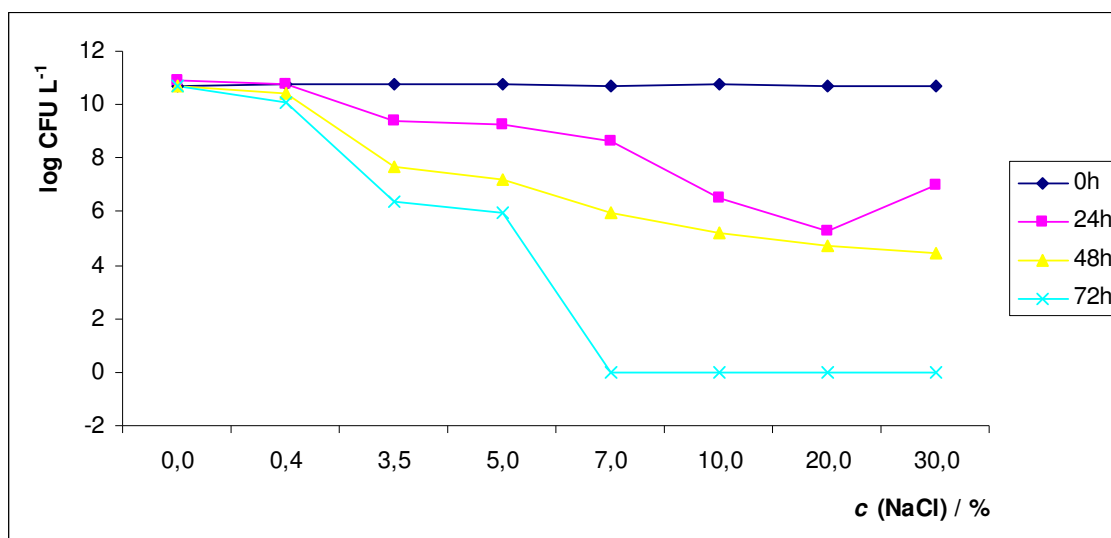
U usporedbi s podlogama bogatim nutrijentima koncentracija natrijevog klorida od 10,0, 20,0 i 30,0%, na podlogama siromašnim nutrijentima istih koncentracija po proteku 24h nalazi se veći broj bakterija. Razlika je za jedan red veličine, odnosno deset puta je veći broj bakterija na mediju siromašnom nutrijentima, a bakterije se nalaze u znatnom broju čak i na podlogama onih koncentracija natrijevog klorida kod kojih na mediju bogatom nutrijentima nije bilo bakterija (dakle, nakon 72h na mediju koncentracije natrijevog klorida 20,0% i nakon 48h pri koncentraciji natrijevog klorida od 30,0%). Smanjena količina organske tvari smanjila je replikaciju *E. coli*, no bakterijama je omogućila duži period preživljavanja pri većim koncentracijama natrijevog klorida tako da se nula stanica ne postiže ni nakon 72h.

Kao i kod medija bogatog nutrijentima i na ovom mediju je utjecaj natrijevog klorida veći na *A. junii* nego na *E. coli*. *A. junii* se replicirala samo u kontrolnoj tikvici i to samo unutar 24h, a već nakon 48h vidljivo je propadanje stanica. Pri koncentraciji natrijevog klorida od 0,4% unutar prva 24h nema razmnožavanja stanica, već je njihov broj blizak početnom, a već nakon 48h se broj stanica smanjuje (Tablica 5).

Tablica 5. Srednja vrijednost CFU *Acinetobacter junii* nakon različitih perioda inkubacije u mediju siromašnom nutrijentima s različitim koncentracijama natrijevog klorida.

| NaCl (%) | CFU <i>A. junii</i> L ⁻¹ | | | |
|----------|-------------------------------------|----------|----------|----------|
| | 0h | 24h | 48h | 72h |
| 0,0 | 4,92E+10 | 7,55E+10 | 5,35E+10 | 5,05E+10 |
| 0,4 | 5,58E+10 | 5,60E+10 | 2,85E+10 | 1,14E+10 |
| 3,5 | 5,49E+10 | 2,55E+09 | 4,50E+07 | 2,50E+06 |
| 5,0 | 5,47E+10 | 1,80E+09 | 1,50E+07 | 9,50E+05 |
| 7,0 | 4,75E+10 | 4,50E+08 | 9,00E+05 | 0 |
| 10,0 | 5,45E+10 | 3,50E+06 | 1,55E+05 | 0 |
| 20,0 | 4,85E+10 | 2,00E+05 | 5,50E+04 | 0 |
| 30,0 | 5,15E+10 | 1,00E+07 | 3,00E+04 | 0 |

Pri koncentracijama od 3,5 i 5,0% natrijevog klorida broj stanica se unutar prva 24h smanjuje za cijeli red veličine, a nakon 72h broj bakterijskih stanica smanjio se za 99,99% u odnosu na početni broj stanica. Pri koncentracijama natrijevog klorida od 7,0% i više nakon 72h u tikvicama više nema prisutnih bakterija (Slika 11).



Slika 11. Srednja vrijednost logaritma CFU *Acinetobacter junii* nakon različitih perioda inkubacije u mediju siromašnom nutrijentima s različitim koncentracijama natrijevog klorida.

Iz rezultata je vidljivo da se u uvjetima smanjene količine hranjivih tvari bakterije razmnožavaju samo pri koncentracijama natrijevog klorida od 0,0 i 0,4% i to samo kroz prvih 24h, dok u svim drugim slučajevima broj bakterijskih stanica pada. Pad je izraženiji što je koncentracija natrijevog klorida veća.

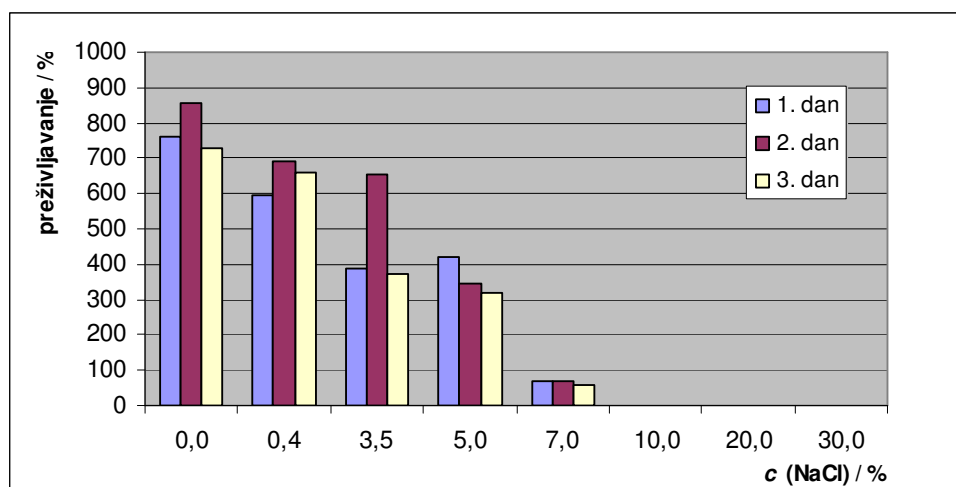
Postotak preživljavanja bakterijskih stanicama tijekom trodnevne inkubacije u tikvicama s različitim koncentracijama natrijevog klorida prikazan je u Tablici 6 i Slikama 12, 13, 14 i 15.

Tablica 6. Preživljavanje *Escherichia coli* i *Acinetobacter junii* tijekom tri dana inkubacije pri različitim koncentracijama natrijevog klorida (0,0-30,0%) u odnosu na početne vrijednosti CFU.

| NaCl (%) | vrijeme (dani) | Preživljavanje (%) | | | |
|----------|----------------|--------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|
| | | medij bogat nutrijentima | | medij siromašan nutrijentima | |
| | | <i>E. coli</i> | <i>A. junii</i> | <i>E. coli</i> | <i>A. junii</i> |
| 0,0 | 1 | 761,94 | 1210,48 | 129,22 | 153,46 |
| | 2 | 857,46 | 1294,02 | 195,58 | 108,74 |
| | 3 | 727,61 | 1425,06 | 173,46 | 102,64 |
| 0,4 | 1 | 596,87 | 1686,88 | 206,68 | 100,36 |
| | 2 | 689,97 | 1736,88 | 136,74 | 51,08 |
| | 3 | 657,68 | 2368,83 | 212,94 | 20,43 |
| 3,5 | 1 | 387,88 | 273,30 | 36,02 | 4,64 |
| | 2 | 656,28 | 253,06 | 31,73 | 0,08 |
| | 3 | 374,46 | 205,78 | 44,06 | 0,00 |
| 5,0 | 1 | 419,32 | 75,32 | 37,23 | 3,29 |
| | 2 | 345,45 | 84,42 | 13,38 | 0,03 |
| | 3 | 317,61 | 66,36 | 16,59 | 0,00 |
| 7,0 | 1 | 70,41 | 1,38 | 8,83 | 0,95 |
| | 2 | 70,23 | 1,09 | 7,68 | 0,00 |
| | 3 | 57,66 | 0,27 | 6,80 | 0,00 |
| 10,0 | 1 | 1,01 | 0,20 | 15,16 | 0,01 |
| | 2 | 0,91 | 0,03 | 7,50 | 0,00 |
| | 3 | 0,57 | 0,00 | 13,20 | 0,00 |
| 20,0 | 1 | 0,04 | 0,15 | 3,13 | 0,00 |
| | 2 | 0,01 | 0,00 | 0,18 | 0,00 |
| | 3 | 0,00 | 0,00 | 0,04 | 0,00 |
| 30,0 | 1 | 0,00 | 0,00 | 0,59 | 0,02 |
| | 2 | 0,00 | 0,00 | 0,08 | 0,00 |
| | 3 | 0,00 | 0,00 | 0,04 | 0,00 |

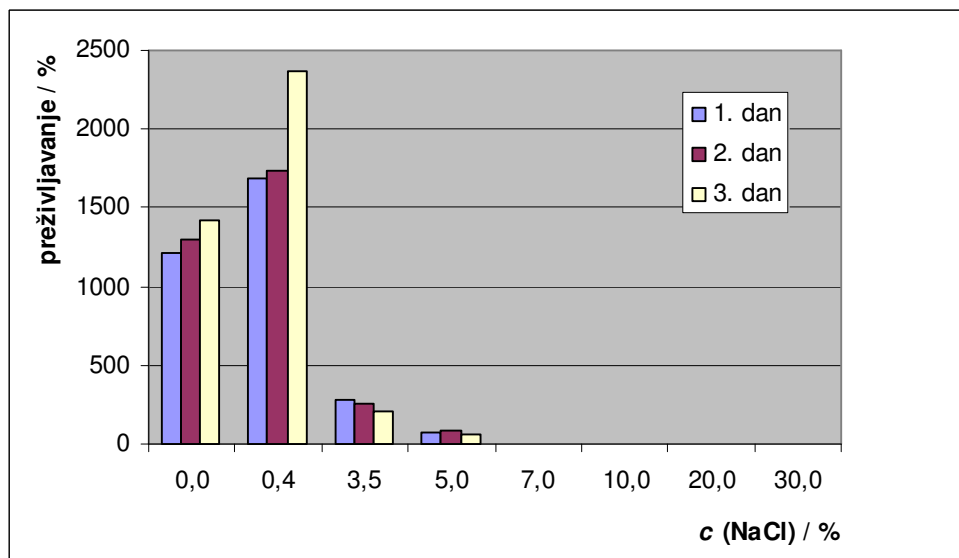
Usporedbom podataka za medij bogatim nutrijentima i medij siromašnim nutrijentima vidljivo je da je replikacija bakterija izraženija u mediju bogatom nutrijentima, odnosno da su bakterije u mediju siromašnom nutrijentima umirale nakon kraćeg vremena inkubacije i pri nižim koncentracijama natrijevog klorida (Tablica 6).

Replikacija *E. coli* u mediju bogatom nutrijentima naglašena je do koncentracije natrijevog klorida od 5,0%. Pri koncentracijama natrijevog klorida većima od navedene smanjuje se stopa preživljavanja tako da ona za koncentraciju natrijevog klorida od 7,0% pada na oko 70% u prva dva dana, za koncentraciju natrijevog klorida od 10,0% ona je oko 1% za prva dva dana replikacije, dok je za koncentracije natrijevog klorida od 20,0 i 30,0% postotak preživljavanja u odnosu na ishodišni CFU 0% (Slika 12).



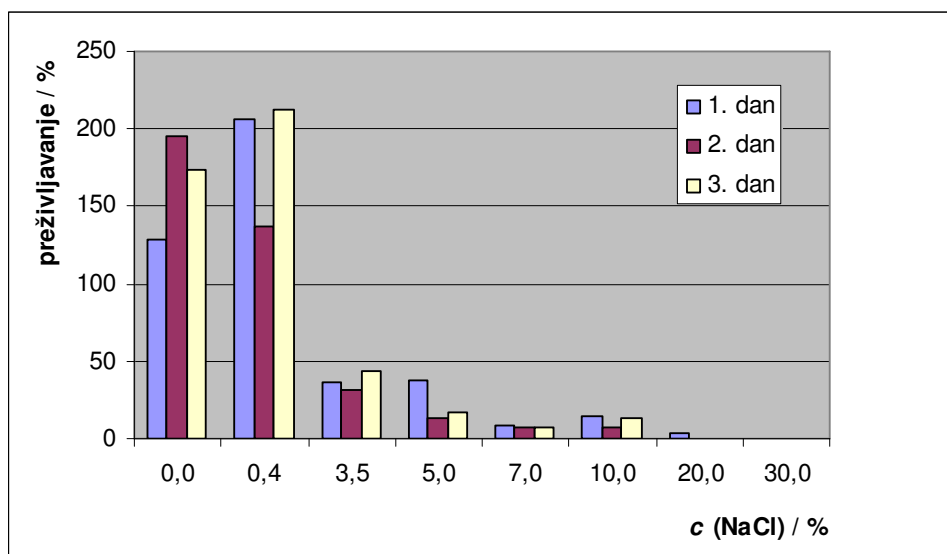
Slika 12. Preživljavanje *Escherichia coli* tijekom tri dana inkubacije na mediju bogatom nutrijentima s različitim koncentracijama natrijevog klorida (0,0-30,0%) u odnosu na početne vrijednosti CFU.

Dok je za *E. coli* granična vrijednost replikacije na mediju bogatom nutrijentima koncentracija natrijevog klorida od 5,0%, za *A. junii* ta je vrijednost manja i iznosi 3,5%. Pri koncentraciji natrijevog klorida od 5,0% stopa preživljavanja u odnosu na početnu vrijednost CFU kreće se oko 75%, a pri većim koncentracijama natrijevog klorida (7,0, 10,0 i 20,0%) bliska je nuli, odnosno iznosi 0% za koncentraciju natrijevog klorida od 30,0% (Slika 13).



Slika 13. Preživljavanje *Acinetobacter junii* tijekom tri dana inkubacije na mediju bogatom nutrijentima s različitim koncentracijama natrijevog klorida (0,0-30,0%) u odnosu na početne vrijednosti CFU.

Kod medija s ograničenom količinom nutrijenata bakterije su pokazale veću podložnost utjecaju povećane koncentracije natrijevog klorida. Višestruko se smanjila stopa preživljavanja, a i granica replikacije pomaknuta je prema nižim vrijednostima koncentracije natrijevog klorida (Slika 14).

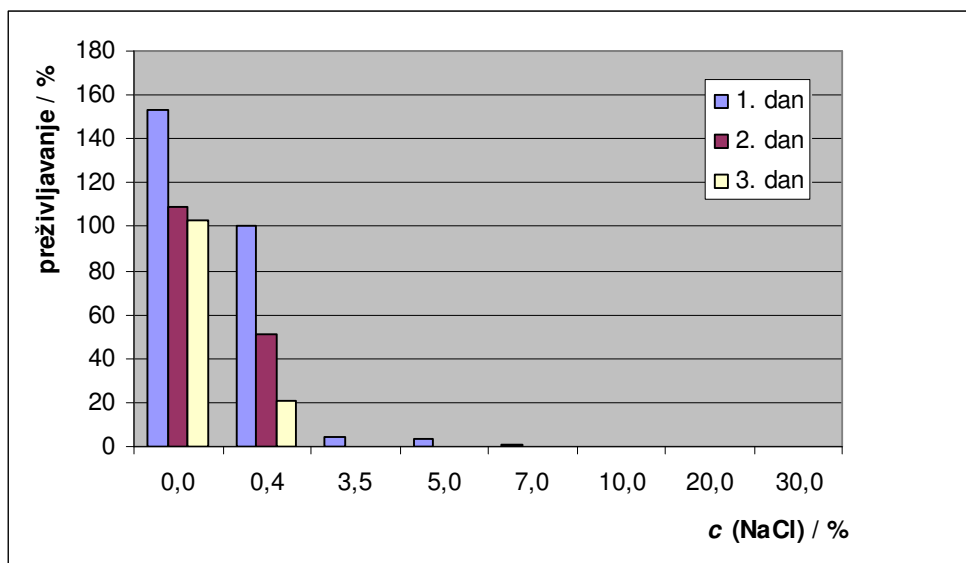


Slika 14. Preživljavanje *Escherichia coli* tijekom tri dana inkubacije na mediju siromašnom nutrijentima s različitim koncentracijama natrijevog klorida (0,0-30,0%) u odnosu na početne vrijednosti CFU.

Kod *E. coli* je preživljavanje u mediju siromašnom nutrijentima u kontrolnoj tikvici pet puta manja od tikvice s istom koncentracijom natrijevog klorida, ali bogatom nutrijentima. Pri koncentraciji natrijevog klorida od 0,4% ta je razlika tri puta u korist bakterija koje žive u mediju bogatom nutrijentima, dok se pri koncentraciji natrijevog klorida od 3,5% ta razlika drastično povećava i iznosi čak 13 puta.

Koncentracija natrijevog klorida od 3,5% je kod medija siromašnog nutrijentima granična vrijednost replikacije. Za usporedbu, ta je vrijednost kod medija bogatog nutrijentima bila na 5,0%. No pri koncentraciji natrijevog klorida od 10,0% u mediju bogatom nutrijentima stopa preživljavanja *E. coli* iznosila je jedva 1%, dok je u mediju siromašnom nutrijentima ta vrijednost iznosila gotovo 12%. Nešto bakterija prisutno je i pri koncentraciji natrijevog klorida od 30,0% dok u mediju bogatom nutrijentima pri toj koncentraciji bakterija nema.

A. junii je u uvjetima smanjene količine organske tvari još osjetljivija na povećanje koncentracije natrijevog klorida. I ovdje je preživljavanje manje u odnosu na preživljavanje u mediju bogatom nutritivnim tvarima, no razlike su drastičnije nego kod *E. coli*. U kontrolnoj tikvici stopa preživljavanja manja je za jedanaest puta, dok je pri koncentraciji natrijevog klorida od 3,5% ta razlika više od tisuću puta. Razlika je vidljiva i u usporedbi s *E. coli* gdje je pri istoj koncentraciji od 3,5% preživljavanje *A. junii* manje osam puta gledano u prvom danu inkubacije. Već u drugom danu inkubacije gotovo da nema bakterija, a situacija je ista pri višim koncentracijama (Slika 15).



Slika 15. Preživljavanje *Acinetobacter junii* tijekom tri dana inkubacije na mediju siromašnom nutrijentima s različitim koncentracijama natrijevog klorida (0,0-30,0%) u odnosu na početne vrijednosti CFU.

4. RASPRAVA

Rezultati provedenog istraživanja slažu se sa zaključcima Burkea i Bairda (1931), koji su u svojim istraživanjima došli do zaključka da mnoge slatkovodne bakterije mogu živjeti u morskoj vodi kojoj su dodane organske tvari. Pokus je pokazao da je u mediju koncentracije natrijevog klorida približno kao u morskoj vodi preživljavanje *E. coli* i *A. junii* vrlo zadovoljavajuće te da bakterije uspješno preživljavaju i razmnožavaju se, ukoliko je u mediju prisutna dovoljna količina nutritivnih tvari. Slične rezultate pokazala su i Krassilnikova (1938) istraživanja te istraživanja Vaccara i suradnika (1950). Oni su pokazali da dodatak organskih tvari morskoj vodi, kao što su glukoza i pepton, smanjuje smrtnost *E. coli*.

Istraživanje Delillea i suradnika (1988) i Delilla i Perreta (1989) je ustvrdilo da smanjena dostupnost nutrijenata reducira aktivnost heterotrofnih bakterija u morskoj vodi. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazali su da je u uvjetima nedostatka hranjivih tvari u mediju nema replikacije bakterija, a i značajno je smanjeno preživljavanje bakterija tako da za *E. coli* ono iznosi svega 36% prvi dan inkubacije. *A. junii* preživljava samo prvi dan inkubacije i to manje od 5%, dok nakon 48h gotovo da je nema. Ogawino istraživanje (1974) pokazalo je da *E. coli* u morskoj vodi ne ugiba zbog autopurifikacije, već zbog gladovanja uzrokovanog nedostatkom hranjivih tvari.

Proučavanjem podataka vidljivo je da je preživljavanje obiju bakterija ne ovisi samo o koncentraciji natrijevog klorida u mediju, već da važnu ulogu ima i dostupnost hranjivih tvari. No osim ta dva čimbenika, ulogu u preživljavanju imaju i drugi faktori. Naime, Anderson i suradnici (1979) su istraživanjem dobili da je preživljavanje *E. coli* nakon 48h u autoklaviranoj morskoj vodi s koncentracijom natrijevog klorida 3,0% iznosio 1,7%, dok je u ovom istraživanju pri bliskoj koncentraciji natrijevog klorida od 3,5% u mediju bogatom nutrijentima dobiveno povećanje broja stanica od čak 656%, a u mediju siromašnom nutrijentima 32%. Očito je dakle da na preživljavanje osim koncentracije natrijevog klorida i dostupnosti hranjivih tvari važan utjecaj imaju i drugi čimbenici.

Neki znanstvenici smatraju da postoji subletalni stres kod koliforma koji se nalaze u otežavajućim uvjetima, npr. život u vodenom okolišu (Anderson et al. 1979). Olson (1978) je zaključio da i sam proces prebrojavanja može biti odgovoran za umiranje koliforma u prirodnim vodama. Ukazao je na to da dio izoliranih koliforma može biti subletalno oštećen te bi tako bio nezamijećen uobičajenim metodama prebrojavanja kao što su rast i produkcija plina.

Anderson i suradnici (1979) primijetili su maksimalni gubitak vijabilnosti *E. coli* tijekom prva dva dana izloženosti morskoj vodi saliniteta 1,5 i 3,0%, dok je pri koncentraciji natrijevog klorida od 1,0% stopa smrtnosti bila značajno niža. Otkrili su subletalni stres u

raznim medijima nakon in vitro izlaganja morskoj vodi različitih saliniteta. Stanice koje su doživjele stres identificirane su prema svojoj sposobnosti da rastu na neselektivnim podlogama, dok na selektivnom mediju ne rastu (Bissonette et al. 1975).

S obzirom na to da su se u ovom istraživanju *E. coli* i *A. junii* uzgajale u neselektivnom hranjivom mediju, subletalni stres ili oštećene stanice mogu se ignorirati.

Činjenica da ispitivane bakterije mogu preživjeti u morskoj vodi kroz nekoliko dana važna je s higijenskog i epiemiološkog stajališta. Poznato je da je *E. coli* bakterija koja se normalno nalazi u fauni crijeva ljudi, no i da je to oportunistička bakterija koja ukoliko se nađe u drugim dijelovima ljudskog tijela može uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme. Moguć izvor zaraze tom bakterijom je i voda, kako morska, tako i riječna i jezerska. Do infekcija dolazi bilo gutanjem onečišćene vode, bilo direktnim kontaktom kože i sluznica s takvom vodom (Duraković 1996) pa su česte upale oka, uha, nosa, kože te dijarea.

Osim u rekreativne svrhe vode se također koriste i za uzgoj školjkaša, rakova i riba te onečišćenje uzrokuje bolesti i tih organizama, a njihovom konzumacijom posredno i ljudi. Također onečišćena voda koristi se za zalijevanje voća i povrća na štandovima da bi duže ostalo svježije (viđeno u neretvanskom kraju). Takvim postupcima izravno se ugrožava zdravlje ljudi, što opet može dovesti do raznih infekcija. Pogotovo je opasan soj *E. coli* O157:H7, koji uzrokuje hemolitički uremijski sindrom, bolest ozbiljnih simptoma i posljedica koje mogu dovesti do zatajenja burega (www.zzjzdnz.hr).

Redovito se provode ispitivanja kakvoće morske vode na plažama, svakih 15 dana po deset puta, sukladno Uredbi o standardima kakvoće mora na morskim plažama (NN 36/96) te se određuje podobnost mora za kupanje, no unatoč tome događa se da kvaliteta mora ne zadovoljava propisane kriterije (www.app2020.net). Problem su otpadne vode, koje se često ispuštaju izravno u more. U većim naseljima postoji sustav javne odvodnje, no čak i u njemu vode velikim dijelom završavaju direktno u moru (www.vodovod-st.hr). Osim toga, brodovi i jahte koji plove Jadranom nerijetko svoje vode ispuštaju u blizini plaža, a onečišćenja uzrokuju i obližnji hoteli, gradilišta te tzv. divlji odvodi (www.mzopu.hr).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da se u koncentracijama soli približno jednakima onima kakve se nalaze u morskoj vodi *E. coli* razmnožava i da broj jedinki raste kroz 48 sati, a nakon 72 sata taj broj je i dalje visok. To znači da jedno lokalizirano onečišćenje predstavlja prijetnju kroz više od tri dana. U uvjetima niže koncentracije natrijevog klorida preživljavanje je još veće, što bi značilo da je u manje slanom okolišu, kakvo je npr. rijeka ili jezero, potrebna veća količina vremena da dođe do autopurifikacije.

Takav okoliš izložen je dužem periodu djelovanja onečišćivača, što znači da je i veća mogućnost obolijevanja životinja i ljudi.

U mediju koji je siromašan nutrijentima preživljavanje je značajno niže u odnosu na medij bogat nutrijentima. U takvom mediju već prvog dana ugine više od 50% bakterija, no ostatak bakterija preživi dulje vremensko razdoblje tako da je izloženost njima produžena, ali je njihova koncentracija manja.

Otpadne vode bogate su organskom tvari, odnosno medij u kojem se bakterije nalaze je bogat nutritivnim tvarima pa će stopa rasta bakterija biti veoma izražena. Najveći broj bakterija i sukladno tome najlošija kvaliteta voda je na mjestima ispusta otpadnih voda u more. Ispuštanje voda je kontinuirano tako da imamo stalan priljev hranjivih tvari i bakterija u morsku vodu. To rezultira stalnim prisustvom *E. coli*, što znači i prisustvom drugih patogenih mikroorganizama.

Za *Acinetobacter junii* nema puno literaturnih podataka. Zasad nema dovoljno istraživanja koja bi utvrdila vezu *A. junii* i zdravlja ljudi, no smatra se da je mala mogućnost uzrokovanja infekcija. *A. junii* je u odnosu na *E. coli* više osjetljiva na povećanje koncentracije natrijevog klorida. Pri koncentraciji natrijevog klorida koja bi odgovarala salinitetu morske vode jedinke *A. junii* se razmnožavaju tako da im se u roku od 14h broj poveća za 273%, a na kraju trećeg dana broj jedinki je u odnosu na početni oko 205%. (Za usporedbu, povećanje broja *E. coli* u mediju bogatom nutrijentima je nakon 24h 387%, a na kraju trećeg dana broj je nešto manji i iznosi 374% više u odnosu na početni broj). Dakle u morskom okolišu *A. junii* može se normalno replicirati, no njen broj se ne povećava toliko koliko *E. coli*, a i zbog upitne patogenosti ne predstavlja toliko problem.

Ono što je zamjetno da se u mediju bogatom nutrijentima, odnosno možemo reći otpadnim vodama koje se ispuštaju u jezera ili rijeke broj *A. junii* drastično povećava i to za skoro 2500% nakon 72h. Ova spoznaja ima svoju primjenu u biološkom pročišćavanju otpadnih voda. Naime *A. junii* je fosfat-uklanjajuća bakterija. Ona veže fosfate iz otpadnih voda i taloži ih unutar stanice. S obzirom na to da joj se u mediju bogatom nutrijentima (kakva je onečišćena voda), a malog saliniteta broj drastično povećava, bolje je uklanjanje fosfata iz vode, odnosno učinkovitije pročišćavanje voda.

U mediju siromašnom nutrijentima, dakle u čistim otpadnim vodama zamjetno je smanjenje broja jedinki tako da je stopa preživljavanja 100% samo prvi dan i to u mediju koncentracije natrijevog klorida 0,4%, dok u morskoj vodi već prvi dan ugibaju gotovo sve jedinke. To znači da ispuštanjem pročišćenih voda u more ne dolazi do značajnijeg zagađenja bakterijama *A. junii*.

5. ZAKLJUČAK

Provedeni eksperimenti pokazali su da su se obje bakterije mogle razmnožavati u mediju bogatom nutrijentima, kao što je Nutrient Broth, pri koncentracijama natrijevog klorida do 5% za *Escherichia coli* odnosno do 3,5% za *Acinetobacter junii*.

Potpuno umiranje *E. coli* dosegnuto je nakon 48h pri koncentraciji natrijevog klorida od 30% te nakon 72h pri koncentraciji natrijevog klorida od 20%. Potpuno umiranje *A. junii* dosegnuto je nakon 48h pri koncentraciji natrijevog klorida od 30% te nakon 72h pri koncentracijama od 20% odnosno 10%.

Ukoliko su iste bakterije uzgajane u mediju siromašnom nutrijentima, povećanje broja *E. coli* je prestao pri koncentraciji natrijevog klorida od 3,5% i višoj. Bakterije su bile sposobne preživjeti duži period vremena pri ekstremnim koncentracijama natrijevog klorida od 20 i 30% budući da potpuno umiranje bakterija nije bilo zamjetno čak ni 72h nakon inkubacije.

Negativan utjecaj natrijevog klorida na *A. junii* naglašen je u uvjetima nedostatka organske tvari. Brzo umiranje bakterijskih stanica zamijećeno je pri koncentraciji natrijevog klorida od 3,5% i višoj.

Objе bakterije su osmotolerantne kada su uzgajane na mediju bogatom nutrijentima, no u mediju siromašnom nutrijentima nisu se aktivno razmnožavale pri koncentracijama natrijevog klorida većima od 0,4% pa ih stoga ne možemo klasificirati kao osmotolerantne.

6. LITERATURA

Abdel-El-Haleem D (2003), *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. African Journal of Biotechnology, **2**, 71-74.

Anderson IC, Rhodes M, Kator H (1979), Sublethal stress in *Escherichia coli*: a function of salinity. Applied and Environmental Microbiology, **38**, 1147-1152.

Bissonette GK, Jezeski JJ, McFeters GA, Stuart DG (1975), Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural water. Applied Microbiology, **29**, 186-194.

Burke V, Baird LA (1931), Fate of fresh water bacteria in the sea. Journal of Bacteriology, **21**, 287-298.

Carlucci AF, Pramer D (1959), Factors affecting the survival of *Escherichia coli* in seawater. Applied Microbiology, **7**, 388-392.

Carlucci AF, Pramer D (1960a), An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in seawater I. Applied Microbiology, **8**, 243-247.

Carlucci AF, Pramer D (1960b), An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in seawater II. Applied Microbiology, **8**, 247-250.

Conner DE (1991), Temperature and NaCl affect growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in poultry-based and laboratory media. Journal of Food Science, **57**, 532-533.

Delille D, Bouvy M, Cahet G (1988), Short term variations of bacterio-plankton in Antarctic zone: Terre Adélie area. Microbial Ecology, **15**, 293-309.

Delille D, Delille E (2000), Distribution of enteric bacteria in Antarctic seawater surrounding the Dumont d'Urville permanent station (Adélie Land). Marine Pollution Bulletin, **40**, 869-872.

Delille D, Perret E (1989), Influence of temperature on the growth potential of southern polar bacteria. Microbial Ecology, **18**, 117-123.

Duraković, S (1996.), Primijenjena mikrobiologija. Prehrambeno tehnološki Inženjering, Zagreb

Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (2006), The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. Springer, New York

Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG (2003), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer-Verlag, New York.

Hajmeer M, Ceylan E, Mardsen JL, Fung DYC (2006), Impact of sodium chloride on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* analysed using transmission electron microscopy. Food Microbiology, **23**, 446-452.

Hrenovic J, Ivankovic T, Tibljas D (2009), The effect of mineral carrier composition on phosphate-accumulating bacteria immobilization, Journal of Hazardous Materials, **166**, 1377-1382.

Jay JM (1992), Modern Food Microbiology. Van Norstand Reinhold Co., New York.

Krassilnikov NA (1938), The bactericidal action of sea water. Mikrobiologiya **7**, 329-334.

Nemec A, Dijkshoom L, Cleenwerck I, De Baere T, Janssens D, van der Reijden TJK, Jezek P, Vaneechoutte M (2003), *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colonyforming species isolated from human clinical specimens. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **53**, 1563-1567.

Nester EW, Anderson DG, Roberts JrCE, Persall NN, Nester MT (2004), Microbiology: a human perspective. McGraw-Hill Inc., New York.

Nusbaum I, Garver RM (1955), Survival of coliform organisms in Pacific Coastal waters. Sewage and Industry Wastes, **27**, 1383-1390.

Ogawa K (1974), Some factors affecting the survival of coliform bacteria in seawater. Journal of Oceanography, **30**, 54-60.

Olson BH (1978), Enhanced accuracy of coliform testing in seawater by a modification of the most-probable-number method. *Applied and Environmental Microbiology*, **36**, 438-444.

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL (2008), *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, **21**, 538-582.

Stein R (2000), Know the enemy: understanding the basis of foodborne pathogens. *Meat Poultry*, **10**, 46-51.

Vaccaro RF, Briggs MP, Carey CL, Ketchum BH (1950), Viability of *Escherichia coli* in sea water. *American Journal of Public Health*, **40**, 1257-1266.

ZoBell CE (1946), *Marine Microbiology*. Chronica Botanica Co., Waltham.

http://www.aap2020.net/Split_05/Bilac.pdf

<http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/Praktikum.pdf>

http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/predavanje_4_02.pdf

http://www.mzopu.hr/doc/Izvjesce_HR_2007.pdf

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC120562/>

<http://www-old.pbf.hr/djezek/ekologija/Predavanje9.pdf>

<http://www.thelabrat.com/protocols/Bacterialspecies/Acinetobacterjunii.shtml>

<http://www.vodovod-st.hr/Onama/Djelatnost/Odvodnja/tabid/79/Default.aspx>

<http://hr.wikipedia.org/wiki/Acinetobacter>

http://hr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli

<http://www.zdravlje.hr/clanak.php?id=12782>

<http://www.zdravlje.hr/clanak.php?id=12783&>

<http://www.zdravlje.hr/clanak.php?id=12784>

http://www.zzjzdnz.hr/djelatnosti/zdravstvena_ekologija/rjecnik